

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-47195

⑮ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)3月7日

C 12 P 13/12  
// C 12 P 41/00  
(C 12 P 13/12  
C 12 R 1:38)  
(C 12 P 13/12  
C 12 R 1:01)

B-8213-4B  
8412-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 含セレンアミノ酸のラセミ化方法

⑯ 特 願 昭59-167908

⑰ 出 願 昭59(1984)8月13日

⑱ 発 明 者 左 右 田 健 次 宇治市木幡御蔵山45-61  
⑱ 発 明 者 田 中 英 彦 京都市伏見区日野慈悲町21-10  
⑱ 発 明 者 中 村 武 史 逗子市久木4-10-8  
⑲ 出 願 人 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

含セレンアミノ酸のラセミ化方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) シュードモナス属またはアエロモナス属に属する菌株を培養し、その培養物またはその培養物から分離した培養菌体またはそれらの処理物の存在下で、セレノシステインまたはセレノホモシステインをラセミ化することを特徴とするセレノシステインまたはセレノホモシステインのラセミ化方法。

(2) セレノシステインまたはセレノホモシステインがセレノシスチンまたはセレノホモシスチンをチオール化合物の存在下で還元して生ぜしめたものであることを特徴とする特許請求の範囲第一項記載の方法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、セレノシステインまたはセレノホモシステインをラセミ化する方法に関し、更に詳

しくはシュードモナス(Pseudomonas)属またはアエロモナス(Aeromonas)属に属する菌株を培養し、その培養物またはその培養物から分離した培養菌体またはその培養菌体からの抽出物の存在下で、セレノシステインまたはセレノホモシステインをラセミ化する方法に関する。

セレノシステインおよびセレノホモシステインは、システインおよびホモシステインの硫黄の代わりにセレンを含むアミノ酸であり、天然界にもごく微量ながら存在することが知られている。これら2種の含セレンアミノ酸は、セレノール基の酸化され易さから、そのままの形での単離は難しいため、これらのアミノ酸の酸化型であって、ジセレニド結合を有するセレノシスチンまたはセレノホモシスチンの形で取り扱われるが、1、4-ジチオスレイトールまたは2-メルカプトエタノールなどのチオール化合物等の還元剤を添加することにより、水溶液中でセレノシスチンおよびセレノホモシスチンから容易に生成せしめることができる。

含硫アミノ酸代謝に関与する多くの酵素反応において、セレノシステインおよびセレノホモシステインは、それ自身が基質となって代謝されると共に、本来の含硫アミノ酸基質に対する拮抗阻害剤としてもはたらく。例えば、シスタチオニン $\beta$ -リナーゼはL-セレノホモシステインとL-セリンからL-セレノシスタチオニンを合成する反応をも触媒するが、この時L-セレノホモシステインはL-ホモシステインに対する拮抗阻害剤になる。またL-セレノシステインはシスタチオニン $\beta$ -リナーゼの基質になり、ピルビン酸とアンモニアおよびセレン化水素に分解される。このように、含硫アミノ酸代謝酵素に基質アナログとして作用するセレノシステイン、セレノホモシステインは、生理活性物質として注目されており今後ますます利用されるようになる可能性が大きい。

セレノシステインおよびセレノホモシステインの酸化型化合物であるセレノシステニンおよびセレノホモシステニンは、主に合成法で作られ、DL-体

として販売されている。しかし、酵素反応の基質として消費されるのは通常L-体であり、有効にDL-体を利用するためにはラセミ化操作が必要とされる。しかし安定ではない含セレンアミノ酸のラセミ化には、水溶液の高温高圧処理は不適当であり、温和な条件で作用する酵素反応を利用するのが最適と考えられた。そこで種々の検討を行なった結果、シュードモナス属またはアエロモナス属に属する菌株のラセマーゼが、セレノシステインおよびセレノホモシステインのラセミ化反応を触媒することを見出し、その発見に基づいて本発明を完成させた。

本発明の目的には、シュードモナス属またはアエロモナス属に属する多くの菌株が用いられ、例えば後述の実施例に示したように、シュードモナス・プテダ (*Pseudomonas putida*) IFO 12996、アエロモナス・プンクタータ・サブスピーシーズ・キャビエ (*Aeromonas punctata* subspecies *caviae*) MT-10243 (FERM BP-21) などが用いられる。

本菌株の培養は通常、振盪培養あるいは通気攪拌深部培養などの好氣的条件下で行なう。培養温度は20~50℃であり、培養中の培地のPHは中性または微アルカリ性付近に維持することが望ましい。培養期間は通常1~3日間である。

培地に使用する炭素源および窒素源は、使用菌の利用可能なものならば何れの種類を用いてもよい。即ち、炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、シュクロース、澱粉加水分解液、糖蜜などの種々の炭水化物が使用できる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種の無機および有機アンモニウム塩類、または肉エキス、酵母エキス、コーン・ステープ・リカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物などの天然有機窒素源が使用可能である。天然有機窒素源の多くの場合は、窒素源であるとともに炭素源にもなり得る。更に無機物として磷酸一水素カリウム、磷酸二水素カリウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、

硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄なども必要に応じて使用すると好都合である。

本発明に使用する酵素源としては、当該菌株の培養物そのまま、または培養液から遠心分離などの方法によって採取した生菌体、その乾燥菌体あるいは菌体を破砕、自己消化、超音波処理などの処理により得られる菌体処理物、更にはこれらの菌体よりの抽出物ならびに抽出物より得られる酵素の粗製物または精製物が利用可能である。もちろん、これらの固定化酵素または固定化菌体でもよい。

セレノシステイン、セレノホモシステインのラセミ化反応は水溶液中で行なわれるが、これらのアミノ酸の濃度には特に制限はない。反応温度は20~50℃、反応液のPHは、添加するチオール化合物がセレノシステニンまたはセレノホモシステニンのジセレニド結合を有効に還元しうる7以上が望ましく、アルカリ側であっても10以下が望ましい。

次に実施例により本発明を説明するが、実施例

におけるセレノシステイン、セレノホモシステインのラセミ化程度は、反応停止後にヨウ化メチルでセレノール基をメチル化した後に液体クロマトグラフィーにかけ、D-体、L-体を分離定量することにより決定した。

#### 実施例 1

シュードモナス・ブチダ IFO 12996 を次の組成の培地 120ml を入れたフラスコに 1 白金耳接種し、30℃で 24 時間振盪培養した。

培地組成	肉エキス	1.0 %
	ペプトン	1.0 %
	塩化ナトリウム	0.5 %

初期 PH 7.2

遠心分離によって得た培養液 40ml 分の菌体を L-セレノシステインのラセミ化反応に供した。L-セレノシステイン 80mg、ピリドキサル 0.5mg、ピロリン酸ナトリウム 100mg を含む水溶液 10ml に 1, 4-ジチオスレイトール 120mg を添加し、PH 8.0、窒素シール下の室温で 10 分間、L-セレノシステインを還元した。得られた L-セレノシ

シュードモナス・ブチダ IFO 12996 を実施例 1 の方法にしたがって培養し、得られた菌体を超音波破碎することにより菌体抽出物を得た。遠心分離後の上清を  $2 \times 10^{-3}$  M ピリドキサル 0.5mg を含む緩衝液 (PH 7.2) に透析したものを粗酵素液として使用した。L-セレノシステイン 80mg、ピリドキサル 0.5mg、ピロリン酸ナトリウム 100mg を含む水溶液 9ml に 1, 4-ジチオスレイトール 120mg を添加して実施例 1 と同様に調製した L-セレノシステイン溶液に、3.2mg のタンパクを含む粗酵素液を 1ml 加え、窒素シールをした試験管中でゆるやかに振盪しながら 37℃で 5 時間反応を行なった。反応液中には L-セレノシステイン 47mg、D-セレノシステイン 28mg が含まれていた。

#### 実施例 5

実施例 4 のシュードモナス・ブチダ IFO 12996 の代わりに、アエロモナス・ブクタータ・サブスピーシーズ・キャピエ MT 10243 (微工研発第 21 号) を用い、また、L-セレノシステインの

ステイン溶液を上記の菌体と混合し、窒素シールをした試験管中でゆるやかに振盪しながら 37℃で 5 時間反応を行なった。反応液中には L-セレノシステイン 41mg、D-セレノシステイン 32mg が含まれていた。

#### 実施例 2

実施例 1 の L-セレノシステインの代わりに D-セレノシステインを用いたところ L-セレノシステインの代わりに、D-セレノシステインが溶液中に得られ、同様の実験を行なった結果、5 時間後の反応液中には D-セレノシステイン 44mg、L-セレノシステイン 33mg が含まれていた。

#### 実施例 3

実施例 1 の L-セレノシステインの代わりに L-セレノホモシステイン 90mg を用い、同様に L-セレノホモシステインのラセミ化反応を行なった。30 分後には反応液中に L-セレノホモシステイン 46mg、D-セレノホモシステイン 42mg が含まれていた。

#### 実施例 4

代わりに L-セレノホモシステイン 90mg を用いて L-セレノホモシステインのラセミ化反応を同様の方法で行なった。酵素液として 26mg のタンパクを含む溶液を加えた。反応開始後 30 分の反応液中には、L-セレノホモシステイン 54mg、D-セレノホモシステイン 35mg が含まれていた。

#### 実施例 6

実施例 4 の 1, 4-ジチオスレイトールの代わりに 2-メルカプトエタノール 90mg を添加して同様の実験を行なった結果、5 時間後の反応液中には L-セレノシステイン 51mg、D-セレノシステイン ~~54mg~~ 23mg が含まれていた。

特 許 出 願 人

三井東圧化学株式会社

46699-2001

**DELPHION****Select****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION****Log Out** **Work Files** **Saved Searches****My Account****Search:** Quick/Number Boolean Advanced Der**The Delphion Integrated View****Get Now:** ☒ **PDF** | [File History](#) | [Other choices](#)**Tools:** Add to Work File: [Create new Work](#)**View:** [INPADOC](#) | **Jump to:** [Top](#) **Go to:** [Derwent](#) [Ema](#)**Title:** **JP61047195A2: METHOD OF RACEMIZING SELENIUM-CONTAINING ACID****Derwent Title:** Racemising of selenium-contg. aminoacid(s) - uses culture of strain of Pseudomonas or Aeromonas genus [\[Derwent Record\]](#)**Country:** JP Japan**Kind:** A**Inventor:** SODA KENJI;  
TANAKA HIDEHIKO;  
NAKAMURA TAKESHI;**Assignee:** MITSUI TOATSU CHEM INC  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)**Published / Filed:** 1986-03-07 / 1984-08-13**Application Number:** JP1984000167908**IPC Code:** Advanced: [C12P 13/12](#); [C12P 41/00](#); [C12R 1/01](#); [C12R 1/38](#);  
Core: [C12P 13/00](#); more...  
IPC-7: [C12P 13/12](#); [C12P 41/00](#);**Priority Number:** 1984-08-13 JP1984000167908**Abstract:** PURPOSE: To racemize seleno(homo)cysteine efficiently by the use of an enzymatic reaction, by using a culture mold of a specific bacterium, etc.

CONSTITUTION: A bacterium such as Pseudomonas putida IFO-12996 belonging to the genus Pseudomonas or Aeromonas punctata subspecies caviae MT-10243 (FERM-BP-21), etc. is used. Namely, a culture material of the bacterium, a culture mold (treated material of it) is brought into contact with seleno(homo) cysteine in an aqueous solution (at about 20W50°C at about 7W10pH), and seleno (homo)cysteine is racemized.

COPYRIGHT: (C)1986,JPO&amp;Japio

**Family:** None**Other Abstract Info:** CHEMABS 105(05)041262S CAN105(05)041262S [DERABS C86-103176](#)  
[DERC86-103176](#)[Nominate this for the Gallery...](#)



BEST AVAILABLE COPY